

オキアミ脂質の抗酸化性と過酸化物分解作用に関する研究

著者	季 鐘?
号	309
発行年	1982
URL	http://hdl.handle.net/10097/16740

氏 名（本籍）	リ 李	チヨン 鐘	ホウ 祐
学 位 の 種 類	農	学	博 士
学 位 記 番 号	農 博 第	3 0 9	号
学位授与年月日	昭 和 5 8 年	3 月	2 5 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科 （博士課程）食糧化学専攻		
学 位 論 文 題 目	オキアミ脂質の抗酸化性と過酸化物分解 作用に関する研究		

論文審査委員（主 査）

教授 金 田 尚 志 教授 安 元 健

助教授 山 内 文 男

論文内容要旨

オキアミ脂質の抗酸化性と過酸化化物
分解作用に関する研究

李 鐘祐

緒言

最大の水産物未利用資源として注目されている南極産オキアミ (*Euphausia superba*) の脂質はリン脂質を多く含み、アイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸などの高度不飽和脂肪酸に富むことが知られている。したがってオキアミを食糧資源として利用する場合は、加工・貯蔵中における含有脂質の酸化が大きな問題となる。しかし、オキアミ脂質は脂肪酸組成から予想されるよりも酸化の進行が遅く、長期間保存中にも過酸化化物価が全く上昇しないという特異な性質を持っている。ところが、酸化の進行が遅いのはどのような抗酸化性物質の存在によるものか、また保存中に過酸化化物価が上昇しないのはいかなる機構、すなわち酸化が進行しないためかあるいは何らかの原因で過酸化化物が蓄積しないためか、

その機構は全く不明である。そこでオキアミ脂質中の抗酸化成分の検索を行なうと共に保存中に過酸化価の上昇しない理由を解明しようとした。

第1章 オキアミ脂質の抗酸化性および過酸化物蓄積の抑制効果

オキアミ脂質の抗酸化性および保存中に過酸化価の上昇を抑える作用を調べるために冷凍保存した生オキアミからクロロホルム/メタノール(2:1)で抽出した全脂質をケイ酸カラムクロマトグラフィーを用いて中性脂質糖脂質およびリン脂質区分に分別した。その含量比はそれぞれ 54:5:41 であった。

第1節 抗酸化成分の検索

オキアミ全脂質およびケイ酸カラムで分別した各脂質区分の抗酸化性を重量法によるオーブンテストによって調べたところ、全脂質はすぐれた抗酸化性を示した。各脂質区分に

ついでみると中性脂質区分が有効で、他の2区分は全く無効であった。中性脂質区分にリン脂質区分を加えると効果が増し、中性脂質区分に対するリン脂質区分の相乗作用が認められた (Fig. 1)。中性脂質区分をさらにケイ酸カラムで分離すると主成分はヘキサン/エーテル (95:5) で溶出するトリグリセリド区分で、この溶出区分のみが抗酸化性を示した (Fig. 2)。以上の結果からオキアミ脂質の抗酸化性物質は中性脂質区分中のヘキサン/エーテル (95:5) 溶出区分に含まれていることがわかったので、この抗酸化性物質を TLC 上で検出し (Fig. 3)、マススペクトルの測定結果からメートコフェロールと推定した。したがってオキアミ脂質の抗酸化性はメートコフェロールによるもので、リン脂質が相乗剤として作用していることが明らかになった。

第2節 過酸化物質蓄積の抑制効果

オキアミ脂質には抗酸化成分としてメートコフェロールが含まれていることを認めたが脂質を長期間保存しても過酸化価が全く上昇しないのはメートコフェロールの作用だけでは説明しにくいので、この理由を知るため全脂質および全脂質のケイ酸カラム各分画区分、すなわちクロロホルム溶出区分（中性脂質）、アセトン溶出区分（糖脂質）、メタノール溶出区分（リン脂質、PL-1）、10%酢酸-メタノール溶出区分（リン脂質、PL-2）の保存中の過酸化価（POV）とカルボニル価（COV）の変化を測定した（Fig. 4）。POVについてみると、全脂質および抗酸化性を認めなかったリン脂質区分ではいずれもPOVが上昇しなかったが、メートコフェロールを含む中性脂質区分は誘導期後POVが大きく増加した。この間COVは各区分とも上昇し、特にPOVの上昇しなかったリン脂質区分では中性脂質区分よりも早期に増大し、POVの上昇しないことは酸化が抑えられるのではなく生成した

過酸化物が直ちに分解されるためであると推定された。この点を明らかにするためオキアミ全脂質およびそのケイ酸カラム各分画区分に2%のリノール酸メチルHPOを加えてPOVの経日変化を調べたところ(Fig. 5), 中性脂質区分ではPOVが著しく上昇する反面, 全脂質およびリン脂質区分ではPOVの急激な減少を示し, リン脂質区分による過酸化物分解作用が認められた。

第2章 各種動植物性脂質の抗酸化性および過酸化物分解作用

オキアミリン脂質の過酸化物分解作用がオキアミに特異的なものかどうかを調べるためいくつかの動植物性脂質をえらび, その抗酸化性および過酸化物分解作用についてオキアミ脂質と比較検討した。Fig. 6は各種全脂質およびリン脂質の抗酸化性を重量法によって調べたものである。全脂質の抗酸化性の強さは米糠脂質>大豆脂質, オキアミ脂質>ひま

わり脂質の卵黄脂質の順となったが、各リン脂質区分には全く抗酸化効果が認められなかった。全脂質中の抗酸化有効成分を調べるためトコフェロール含量を測定した結果、トコフェロールの多い脂質ほど抗酸化性が強い傾向を示し、各脂質中の主な抗酸化成分はトコフェロールであることが推定された。米糠脂質がトコフェロール含量に比して抗酸化効果が強かったのはフェルラ酸誘導体などによるものと思われる。次いで各種全脂質の保存中のPOVの変化をみるとリン脂質含量の高い脂質ではPOVの上昇が抑えられる傾向が認められた。一方リン脂質含量が特に低かったひまわり脂質のPOVは著しく高くなった(Fig.7)。したがって脂質の保存中にPOVの上昇が抑えられるのはリン脂質含量の高い脂質に共通した性質のように思われたので、この点を明らかにするために各種脂質のリン脂質区分に5%のリノール酸メチルHPDを添加してPOVの経時的变化を測定した(Fig.8)。その

結果、いずれのリン脂質区分もPOVの低下すなわち過酸化化物分解作用を示したが、各リン脂質間の過酸化化物分解作用の強さと初期段階の分解パターンには大きな差が認められ、その原因はリン脂質の組成の相違によるものではないかと考えた。しかしTLC上で検出された各リン脂質の主成分はホスファチジルコリンであり、その組成はほぼ等しく、過酸化化物分解作用の大きな差を説明できなかった。一方、各種リン脂質の保存中のPOVの変化をみると、どのリン脂質区分でも初期には増加し、その後急激に減少するので過酸化化物分解作用は経時的に強くなることが予測された。そこで、その原因は保存中のリン脂質の組成変化によると思われたので各種リン脂質の保存前後の組成変化をTLC-Densitometry法によって検討した(Fig. 9)。その結果、各リン脂質区分とも保存後には主成分であるホスファチジルコリンの含量が非常に減少する反面分解・重合物と思われる極性物質が増加した

か、過酸化化物分解作用の強い区分ほど変化が著しかった。したがってリン脂質の過酸化化物分解作用はその酸化生成物に基因すると推定された。

第3章 オキアミレシチン区分の過酸化化物分解作用と褐変反応との相関々係

第2章の結果から各種リン脂質の過酸化化物分解作用を比較するとオキアミリン脂質がもっとも強く、また過酸化化物分解作用は保存中に生成した分解物および重合物によるものと予想された。そこで、この点を確かめるため保存期間の異なるオキアミレシチンを調製しこれらの過酸化化物分解作用を検討した (Fig. 10)。その結果、過酸化化物分解作用は保存日数が長くなるにつれ強くなる傾向が認められた。一方リン脂質は保存中に著しく褐変し、褐変と過酸化化物分解作用との相関が予想されたので、オキアミレシチン区分の 45°C 保存中の各特数の変化を調べた (Fig. 11)。POVにっ

いてみると初期の急速な増加後直ちに低下し過酸化化物分解作用を示す反面、褐色度はC
O₂とともに初期から増加しPOVの急激な減少の
みられる時期に著しく強まったので、この
兩者には相関があるように思われた。次い
でオキアミレシチンの過酸化化物分解作用およ
び褐変反応におよぼす不飽和脂肪酸の関与を
調べるため、オキアミレシチンの水添したも
のに5%のリノール酸メチルHPOを加えて
保存中のPOVと褐色度の変化を調べた。その
結果、オキアミレシチンは水添によって過酸
化物分解作用および褐変反応がほとんど抑え
られることがわかった (Fig. 12)。以上の結果
からリン脂質の過酸化化物分解作用と褐変反応
の間にはよい相関があり、またこれらの反
応には不飽和脂肪酸が寄与するものと判断さ
れた。つぎにリン脂質の過酸化化物分解作用に
いずれの官能基が関与するかを調べるため、
オキアミレシチンの各種加水分解物について
検討を行なった (Fig. 13)。すなわち各種加水

分解物に 5% のリノール酸メチル HPO を添加した後、POV の変化をみると、ジグリセリド区分では初期から急速な上昇を示す反面未処理レシチンがもっとも強い分解作用を示し、次いでレシチンからコリンを除いたホスファチジン酸および脂肪酸 1 分子を除いたリゾレシチンはいずれも弱いながらも過酸化化物分解作用を示したので、リン脂の過酸化化物分解作用の発現には分子中のリン酸基とコリン基の関与が示唆された。この際の褐色度は過酸化化物分解作用の強い区分ほど著しい変化を示し両者間にはよい相関がみられた。

第 4 章 酸化オキアミレシチン中の過酸化化物

分解作用物質の分離とその化学的性状

オキアミリン脂質中の過酸化化物分解作用を示す原因物質を検索するため、まずオキアミレシチン区分から過酸化化物分解作用の強い物質区分を分離しようとした。Fig. 14 は極性によって二分したオキアミレシチン区分を 45

°C で 7 日間保存した後 DEAE-cellulose カラムを用いて分離した結果である。各区分の溶出量をみると、極性の弱いクロロホルム/メタノール (1:1) 区分はクロロホルム/メタノール混液で約 80 % の溶出量を示したが、極性の強いメタノール区分の場合は MeOH(1) 以後の溶出量が約 5 % ほどあり、メタノール区分の過酸化化物分解作用の強さはこれらの極性物質によるものと思われた。DEAE-cellulose カラム各分離区分の過酸化化物分解作用について調べてみると、概ね極性に応じて強くなる傾向を示したが、特に MeOH(1) 溶出区分はもっとも強い分解作用を示した (Fig. 15)。

Table 1 は各分離区分の平均分子量を測定した結果でもっとも分解作用の強かった MeOH(1) 区分は 186 と 151 の非常に小さい値を示し分解物区分である反面、つぎに効果のあった $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} (80:20) - \text{NH}_4$ 塩区分は 1940 以上の高い平均分子量を示し重合物区分であることがわかった。一方各分離区分はまだ混合物で

あるか、リンとコリンを平均分子量から算出した1モル当りのモル数を見ると、MeOH (1) 区分にはリン 0.13モル、コリン 0.11モルとなり、これは不純物と考えられる数値である反面、CHCl₃/MeOH (80:20)-NH₄塩区分の場合は両成分ともに2モル程度含まれてリンとコリンの含量と過酸化化物分解作用との直接的相関は認められなかった。また各分画区分のDPPH還元力の測定結果からもMeOH (1) 区分はほとんど還元力を示さない反面、CHCl₃/MeOH (80:20)-NH₄塩区分は強い還元力を示し、両者には大きな差がみられ過酸化化物分解作用物質の多様性が推測された。以上の結果からオキアミリン脂質の過酸化化物分解作用はリン脂質の酸化後にはじめて現われるものでその原因物質は単一物質ではなく、リン脂質の分解によって生成した低分子区分と重合による高分子区分と性質が異なった2種類に大別できることがわかった。低分子区分のMeOH (1) 区分はクロロホルムやエーテルに難溶、アル

ロールに可溶、水には石ケン状に分散する極性物質で容易に褐変重合し不安定な性質を示した。本区分は Fig. 16 に示したように逆相系の HPLC で 2 成分に大別されたが回収率が極端に悪かった。一方逆相 TLC では原臭物質以外に 3 成分にわかれ、いずれの区分も過酸化化物分解作用を示したが、その主成分は F1 区分であった。以上の結果から酸化オキアミレシチン中の過酸化化物分解作用物質にはいくつかの成分が関与していることが明らかになった。

第 5 章 総括

南極産オキアミ脂質はポリエン酸に富むにもかかわらず比較的安定性にすぐれ、保存中に過酸化物を蓄積しないという特異な性質を持っている。この原因について検討し以下のような結果を得た。

1) オキアミ脂質の抗酸化性は $430 \mu\text{g/g}$ 油含まれるメートコフェロールの効果とリン脂

質の相乗作用によって発現されている。しかし、メートコフェロールの効果では過酸化物が蓄積しない理由を説明できない。

2) 保存中に過酸化物が蓄積しないのは、酸化が抑えられるためではなく、生成したH₂O₂がすみやかに分解されるためである。

3) 過酸化物分解作用はリン脂質区分に見出されたことからリン脂質に共通な性質と思われ、中でもオキアミリン脂質は特に分解作用が強かった。

4) リン脂質の過酸化物分解作用はリン脂質の酸化の進行とともに強くなったことからリン脂質の酸化生成物が分解作用を有することになった。

5) リン脂質の酸化生成物を分別して調べたところ、重合物および低分子分解生成物両者に過酸化物分解作用が認められ、各種酸化生成物が複合的に作用して過酸化物を分解することが明らかになった。

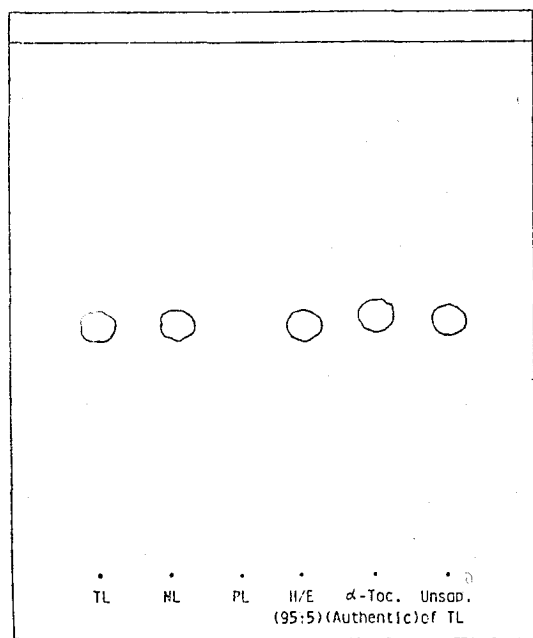


Fig. 3. Thin-layer chromatographic detection of the antioxidant principle in krill lipids.

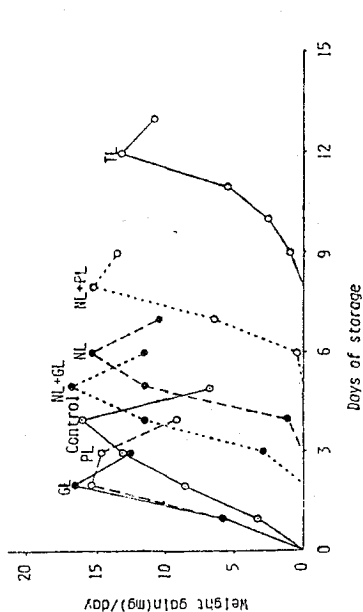


Fig. 1. Increase in weight of methyl esters of safflower oil containing various krill lipid preparations. Krill lipids were added at a level corresponding to 5% of total lipids and incubated at 45°C.

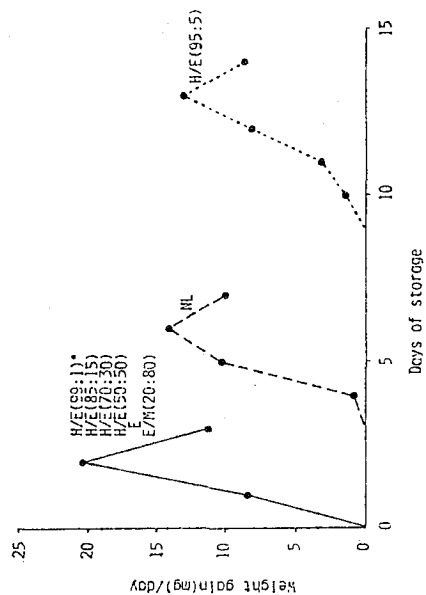


Fig. 2. Comparison of antioxidant effects of individual classes of krill neutral lipids fractionated by silicic acid column chromatography.

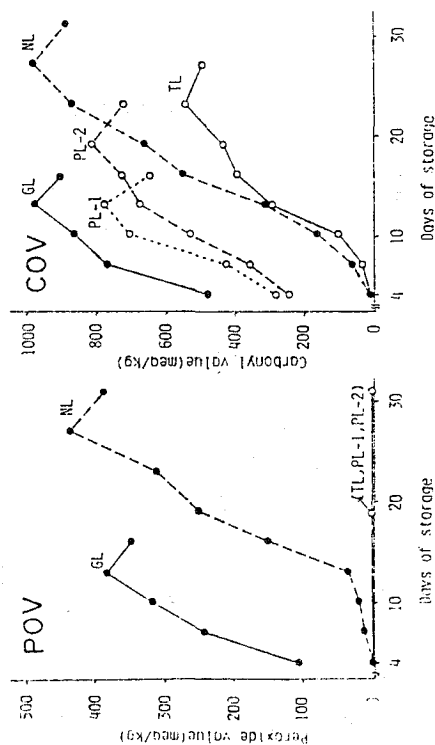


Fig. 4. Changes in POV and COV of krill lipids fractionated by silicic acid column chromatography during storage at 45°C.

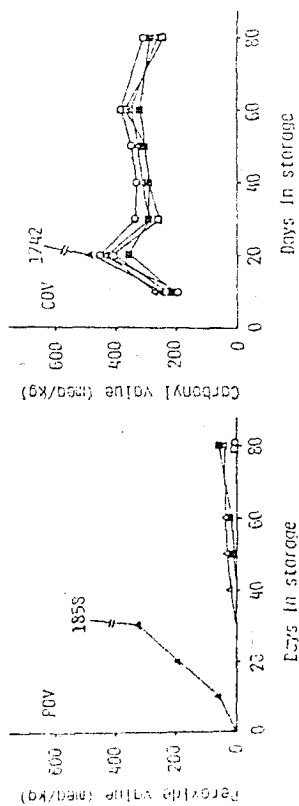


Fig. 7-Changes in POV and COV of total lipids during storage at 45°C:
 —○— Soybean; —■— Sunflower seed; —□— Egg yolk;
 —○— Krill.

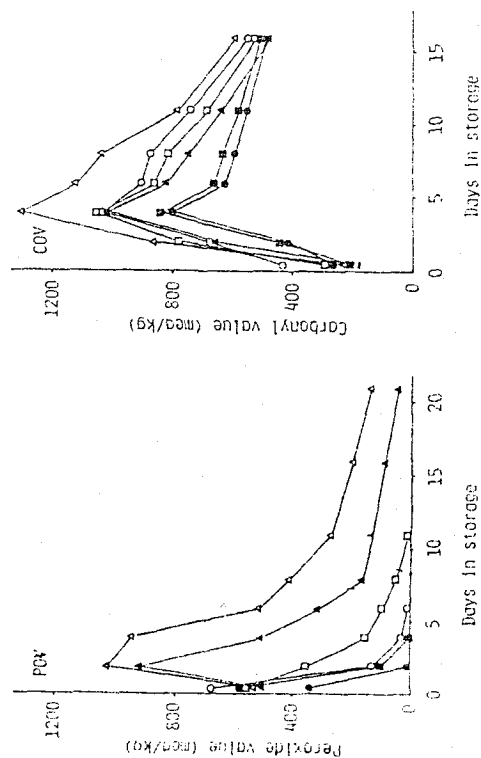


Fig. 8-Changes in POV and COV of phospholipid preparations after addition of methyl linoleate hydroperoxides at a 5% level: —△— Soybean PL-1; —□— Soybean PL-2; —○— Egg yolk PL-1; —○— Krill PL-2.

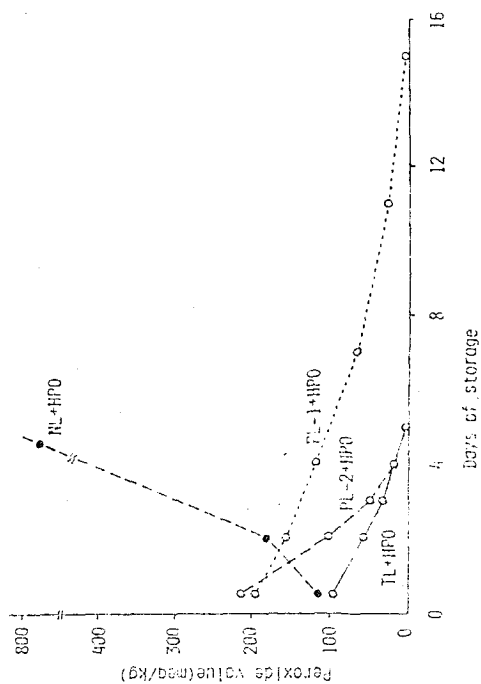


Fig. 5. Changes of POV in krill lipids after addition of methyl linoleate hydroperoxide.

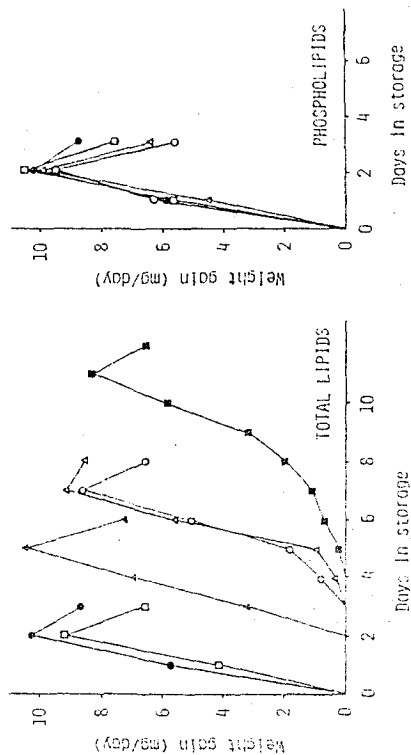


Fig. 6-Comparison of antioxidative activities of total lipids and their phospholipids. Total lipids and phospholipids were added respectively at 5 and 10% levels to methyl esters of soflower oil and stored at 45°C: —○— Control; —○— Soybean; —■— Sunflower seed; —○— Rice bran; —○— Egg yolk; —○— Krill.

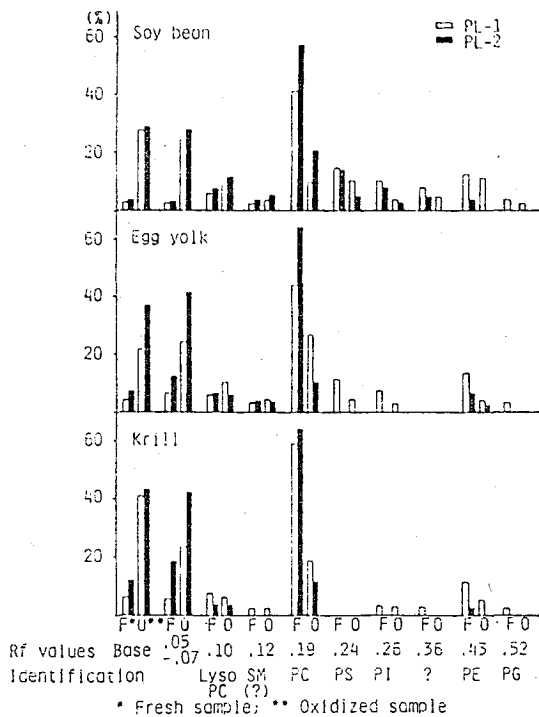


Fig. 9-Changes in phospholipid composition after keeping for 30 days at 45°C.

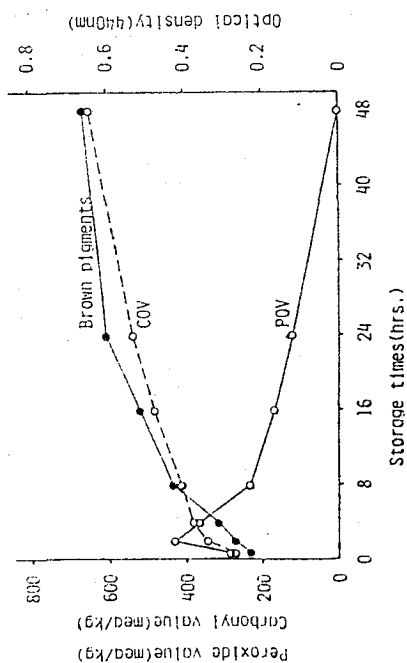


Fig. 11. Changes in POV, COV and brown pigments of krill lecithin during storage at 45°C.

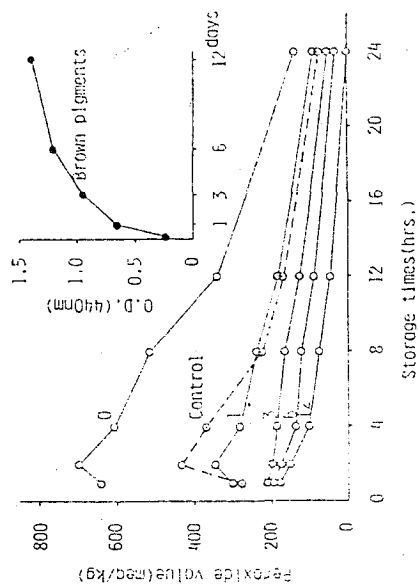


Fig. 10. Comparison of peroxide degradation activities of Krill lecithins with various oxidation levels.

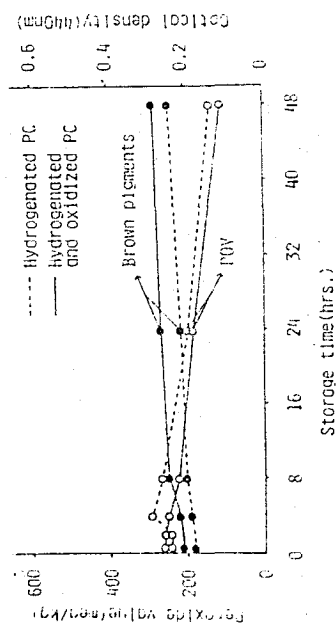


Fig. 12. Effect of hydrogenation on changes in POV and browning.

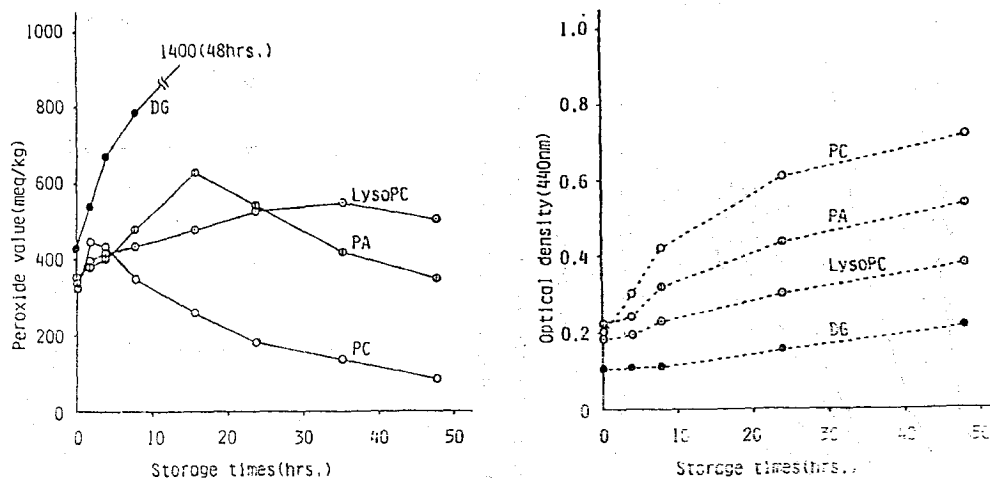


Fig. 13. Changes in POV and brown pigments of some enzymatic hydrolysis products of krill lecithin after addition of methyl linoleate hydroperoxide at a 5% level.

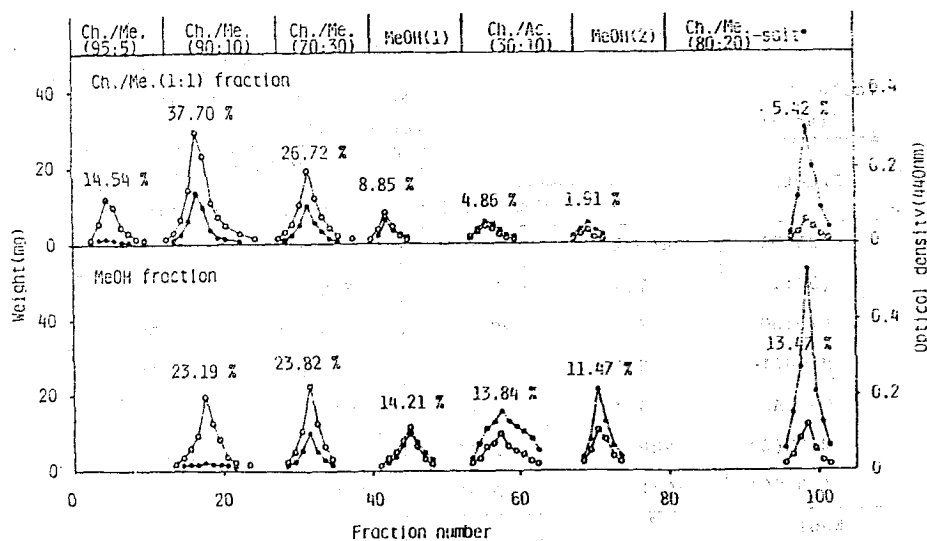


Fig. 14. Fractionation of oxidized krill lecithins by DEAE-cellulose column chromatography.

•• Weight •• Optical density at 440 nm
 * Contained 2% of H₂O and 0.1M of AcOH

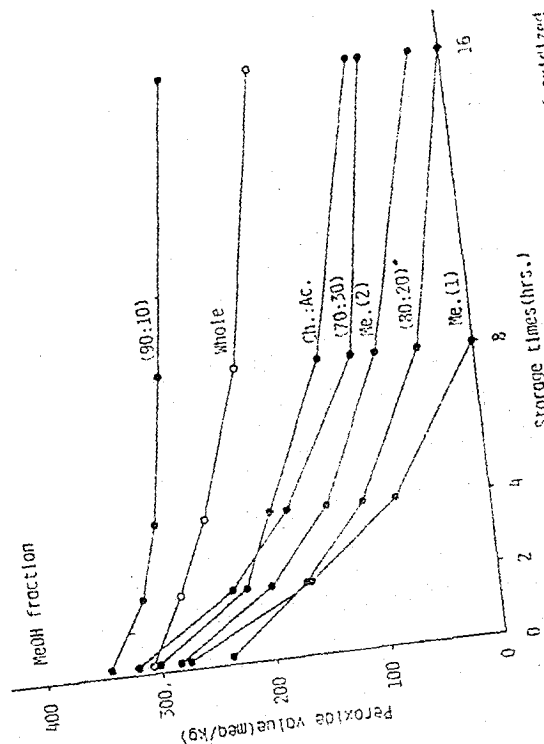


Fig. 15. Changes in peroxide value of DEAE-cellulose column fractions of oxidized krill lecithin after addition of methyl linolate hydroperoxide at a 5% level.

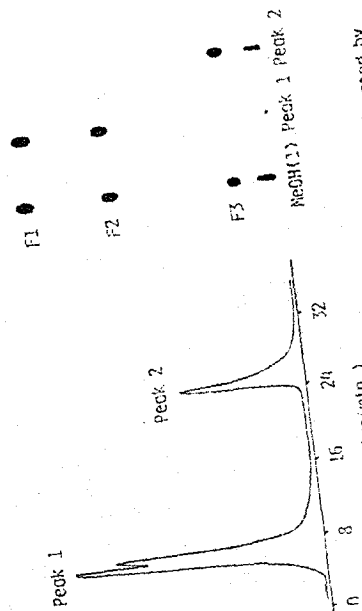


Fig. 16. HPLC and HPTLC of MeOH(1) preparation fractionated by DEAE-cellulose column chromatography.

Table 1. Mean molecular weight of oxidized krill lecithins fractionated by DEAE-cellulose column chromatography.

Fractions	CHCl ₃ /MeOH(1:1) fraction		MeOH fraction	
	M.M.W.	Composition	M.M.W.	Composition
(95:5)	445.2	14.54%	602.0	23.10%
(90:10)	447.4	37.70	464.6	23.62
(70:30)	308.9	26.72	150.9	14.21
MeOH(1)	186.0	8.85	644.3	13.84
Ch.:Ac.	595.4	4.86	748.9	11.47
MeOH(2)	889.7	1.91	1811.5	13.47
(80:20)*	1941.6	5.42		
Whole			584.5	
Fresh	805.1		645.6	
Oxidized	360.1			

審 査 結 果 の 要 旨

南氷洋に棲息する沖アミは最大の未利用水産資源とされ、その開発は進行中だが、プロテアーゼによる自己消化が進みやすいほか、高度不飽和酸に富む脂質を含むため加工、貯蔵中含有脂質の劣化による変敗をおこしやすい。

ところが、本脂質の劣化過程をみるとカルボニル価(COV)の著しい上昇は認められるが過酸化物価(POV)は上昇しないという不思議な性質をもっている。

本研究はこうした沖アミ脂質の特異性につきどのような理由でこうした現象が現れるかを明らかにしようとしたものである。

本論文は5章よりなっているが、その第1章において、POVが上昇しないのは強力な抗酸化剤の存在に由来するか否かを明らかにするためケイ酸カラムクロマトグラフィーにより脂質を分画し α -トコフェロール(α -Toc)の存在を認めた。しかし、POVが上昇しなくてもCOVが上昇するという事実は α -Tocの存在だけでは説明出来ぬため、リノール酸メチルヒドロペルオキシド(HPO)に各分画区分を添加して放置したところ、リン脂質区分を添加するとPOVは急速に減少することに気づいた。すなわち、本結果によると、リン脂質の自動酸化物はHPOを分解しカルボニル化合物を生成させるという性質をもつといえた。そこで、第2章においては大豆や卵黄から分離したリン脂質を用いHPO分解作用をみたところ、沖アミリン脂質ほどではないがやはり同様な作用が認められた。

第3章では沖アミリン脂質の主要成分であるレシチンを分離し、その過酸化物分解作用を検討したところ、レシチンは褐変が進行するほどHPO分解作用が強まること、水添レシチンは殆んど分解作用を示さないことなどを認めた。

第4章ではDEAE-セルローズカラムにより酸化レシチンの分画を行い、メタノール溶出区分の分解作用がもっとも強く、クロロホルム：メタノール(8:2)区分がこれに次ぐことを認めている。これらの分子量を比較してみると前者は150、後者は1940で、これは重合物といえた。このほか、コリンおよびその分解物を含む水溶性区分にも分解作用を認めている。

以上のごとく本研究は従来まったく知られていなかったリン脂質酸化物のヒドロペルオキシド分解作用を見出したもので、油脂化学および食品工業の分野に新知見を加えたと認められるところから農学博士の学位を与えるに十分な価値を有すると判定した。